

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen über die Nachweisbarkeit der Blutkörperchen-Merkmale Fy und Ss in Blutspuren

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Verena Thielemann
aus Cottbus

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. F. Schleyer

Untersuchungen über die Nachweisbarkeit der Blutkörperchen-Merkmale Fy und Ss in Blutspuren

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Verena Thielemann
aus Cottbus

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 20. Februar 1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. H. Oepen
Referent:	Prof. Dr. F. Schleyer
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. H. Heuser

I n h a l t

	Seite
1. <u>Einleitung: Literatur und Fragestellung</u>	1
2. <u>Eigene Untersuchungen</u>	1
2.1. Material	1
2.1.1. Anlegen von Blutflecken	1
2.1.2. Testerythrozyten	2
2.1.3. Antiseren	2
2.2. Duffy-Merkmale (Absättigungsversuche)	2
2.2.1. Technik des Absättigungsversuches	2
2.2.2. Versuche	4
2.2.2.1. Bromelinversuch	4
2.2.2.2. Albuminversuch	8
2.2.2.3. Versuche ohne Fermentzusatz	8
2.2.3. Besprechung der Ergebnisse	18
2.3. Ss-Merkmale (Absättigungsversuche)	18
2.3.1. Versuche	18
2.3.1.1. Bromelinversuche	18
2.3.1.2. Albuminversuche	20
2.3.1.3. Coombs-Test ohne Bromelin und S-Nachweisverfahren	20
2.3.2. Besprechung der Ergebnisse	31
2.4. Absorptions-Elutionsversuch (Duffy- und Ss-Merkmale	32
2.4.1. Technik	32
2.4.1.1. Technik mit Rinderalbumin	33
2.4.1.2. Technik mit kompletten Antiseren	33
2.4.1.3. Antihumanglobulin-Verfahren	34
2.4.2. Versuche	35
2.4.3. Besprechung der Ergebnisse	40
3. <u>Zusammenfassung</u>	41
4. <u>Literatur</u>	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung: Literatur und Fragestellung

Im Absorptions-Elutionsversuch gelang es LINCOLN und DODD, den Nachweis von Ss im Coombs-Verfahren zu führen, aber nur mit einem der 3 angewandten inkompletten Antiseren bei einer Absättigungstemperatur von 37°C . Versuche mit 4 verschiedenen kompletten Antiseren wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen und waren erfolglos. Ebenso ohne Erfolg verlief der s-Nachweis im Absorptions-Elutionsversuch, der mit 3 verschiedenen inkompletten Antiseren im Coombs-Test ausgeführt wurde.

RUFFIÉ und DUCOS wiesen das Fy(a)-Merkmal mit Hilfe der Gefriertrocknung im Absättigungsversuch nach. Die Absättigungszeit bei 37°C im Wasserbad betrug 36 Stunden, der Titer des Antiserums wurde auf 1:8 verdünnt. Das Merkmal konnte aber nur an maximal 6 Tagen alten Spuren nachgewiesen werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war eine systematische Prüfung der Nachweisbarkeit der Merkmale Ss und Fy mit Hilfe als optimal erwiesener Methoden.

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Material

2.1.1. Anlegen von Blutflecken

Für die Untersuchung wurden 4 Blutflecken angelegt. Dazu wurden saubere Leinenstücke in der Größe von etwa 12 x 10 cm mit Probandenblut bekannter Merkmale betropft und beschriftet. Die Lappchen wurden zuerst bei Zimmertemperatur getrocknet. Dann wurde die eine Hälfte des Lappchens bei Zimmertemperatur, die andere im Kühlschrank bei 4°C in einem verschlossenen Karton aufbewahrt.

2.1.2. Testerythrozyten

Aus frischen, höchstens bis zu 1 Woche alten, im Kühlschrank aufbewahrten Blutproben bekannter Gruppenzugehörigkeit wurde für jeden Versuch nach 1-3maliger Waschung eine 2-5%ige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

2.1.3. Antiseren

Es wurden Seren der Firmen Molter, Ortho, Asid und Bio-test verwendet. Die Titer der inkompletten Anti-Fy- und Anti-s-Seren betrugen:

Anti-Fy(a)	1:64
Anti-Fy(b)	1:16-32 (sehr schwach)
Anti-s	1:64
i-	1:16

Beim Absättigungsversuch ist es wichtig, Antiseren mit niedrigem Titer zu verwenden. Die oben erwähnten Seren waren daher gut geeignet.

2.2. Duffy-Merkmale

2.2.1. Technik des Absättigungsversuches

Prinzip: Ein Stück des blutberleckten Stoffes wird mit Antiserum in Agglutinationsröhrchen inkubiert. Eine Titersenkung zeigt Gruppenzugehörigkeit an.

Ausführung: Von dem bei Zimmer- oder Kühlschranktemperatur aufbewahrten Blutlappchen wird ein etwa 1 cm² großes Stück herausgeschnitten, in einzelne Fäden zerlegt und in vorher beschriftete Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 6-8 mm gebracht. In diese gibt man mit einer Mikropipette 3 Tropfen eines Antiserums hinzu, so daß alle Fasern gut durchtränkt sind und sich später gerade noch 2 Tropfen Antiserum absaugen lassen. In gleicher Weise ist ein Leerversuch (Stoffkontrolle) anzustellen, bei dem ein ebenfalls

1 cm² großer sauberer Stoff aus der allernächsten Umgebung des Blutflecks verwendet wird.

Der für den Absättigungsversuch aufgefaserter Stoff saugt eine bestimmte Menge Antiserum auf, die dann zur Herstellung der Verdünnungsreihe verloren geht. Wird also die Antiserummenge bei gleichbleibender Blutspurenmenge unterschritten, so ist der Überstand nicht groß genug, um eine exakte Verdünnungsreihe anlegen zu können.

Die Röhrchen werden mit Gummistopfen verschlossen. Die Absättigung geschieht bei 4°, 22° oder 37°C für etwa 24 Stunden. Nach der Absättigungszeit werden die Ansätze zentrifugiert, und das überstehende Serum wird autitriert.

Anlegen einer geometrischen Verdünnungsreihe zur Titerbestimmung im Coombs-Test

1. In einem Röhrchenständer werden in 3 Reihen je 6 beschriftete Agglutinationsröhrchen für die Verdünnung 1:2-64 bereitgestellt:

1. Reihe: Spurtiter
2. Reihe: Kontrolltiter
3. Reihe: NaCl-Titer

2. In jedes Röhrchen werden 2 Tropfen physiologische Kochsalzlösung vorgelegt.

3. In jedem 1. Röhrchen der 3 Reihen wird das entsprechende Antiserum hinzugegeben.

4. Inhalt des Röhrchens Nr.1 mischen, 2 Tropfen absaugen und in Röhrchen Nr.2 übertragen, wieder mischen usw. Die letzten 2 Tropfen gibt man in ein leeres Röhrchen, um notfalls die Verdünnungsreihe fortsetzen zu können.

5. Allen Röhrchen gibt man 2 Tropfen einer 5%igen Erythrozyten-Suspension zu.

6. Serum und Blutzellen werden gut vermischt, das Röhrchen fest zugestöpselt.

7. Das Ganze wird bei 37⁰C 1 Stunde lang inkubiert, aufgeschüttelt und 3-4mal mit NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wird die Waschflüssigkeit möglichst vollständig entleert.

8. Zum Erythrozytensediment werden 1-2 Tropfen Anti-humanglobulinserum hinzugefügt. Dann wird möglichst sofort bei 500-1000 U/min. 1 Minute zentrifugiert.

9. Das Röhrchen mit dem Erythrozytensediment wird vorsichtig gedreht oder unter leicht kreisenden Bewegungen auf Agglutination geprüft.

2.2.2. Versuche

2.2.2.1. Bromelinversuch

Durch Fermentierung der Testblutkörperchen erhält man eine Erhöhung der Agglutinationsneigung und die Vermehrung der Antigenplätze. So beträgt z.B. die Anzahl der Antigenplätze für A und B ungefähr 0.17 bis 1.2×10^6 , selbst das schwächste A zählt noch mehrere 100 000 Antigenplätze. Dagegen liegen im Rh-System etwa 1/10 davon vor, beim Kellfaktor nur 1/40 und bei Fy(a) nur 1/100 (GAILLARDON). Da aber in den meisten Fällen nur wenig Spurenmaterial vorhanden ist, wurde versucht, mit möglichst wenig Fleckensubstanz zu Ergebnissen zu kommen.

Eine Enzymvorbehandlung des Wirkstoffes bei der Untersuchung auf Rh-Merkmale hat sich als sehr vorteilhaft erwiesen. Die Empfindlichkeit des klassischen Absättigungsversuches war deutlich erhöht, so daß die Rh-Merkmale sich bis zu etwa 2 Monaten im Absättigungsversuch nachweisen ließen, im Absorptions-Elutionsversuch wesentlich länger (BORNISCHUEVER).

Es wurden deshalb die in Faden zerlegten Blutflecken, die die Spuren Fy(a) oder Fy(b) enthielten, mit Bromelinlösung vorbehandelt. Gleichzeitig wurde das Antiserum hinzugegeben. Im Absättigungsverfahren mit Bromelin wurden 5

Versuche bei 22°C, 1 Versuch bei 37°C zur Bestimmung von Fy(a), 4 Versuche bei 22°C und 5 Versuche bei 37°C zur Bestimmung von Fy(b) gemacht.

Ansatz 1

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet, Spurenalter: 6 Tage,
2.5 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
1 Tropfen Bromelin,
5%ige Erythrozyten-suspension,

Absättigung: 14 h bei 37°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 1. Absättigungsversuch mit enzymvorbehandeltem Flecken bei 37°C

- +++ großes Agglutinat mit Zerfall des Randsaumes
- ++ mittelgroße Agglutinate
- + kleine Agglutinate
- ± gerade noch erkennbare Agglutinate
- keine Agglutination
- () ein so bezeichneter Wert ist 1/4 Stufe niedriger

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	++	(++)	+	(+)	±	(+)	0
Stoffkontrolle	+++	(++)	+	+	±	±	0
Antiserum	+++	++	(++)	+	(+)	±	

Ansatz 2

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet, Spurenalter: 17 Tage
2.5 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
1 Tropfen Bromelin,
5%ige Erythrozytensuspension,

Absättigung: 19 h bei 22°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 2. Absättigungsversuch mit enzymvorbehandeltem Flecken bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	++	++	++	±	-	-	1.0
Stoffkontrolle	++	++	++	+	±	-	1.0
Antiserum	++	++	++	++	+	±	

Gleichzeitig wurde ein Parallelversuch ohne Bromelin mit der gleichen Absättigungszeit und -temperatur vorgenommen.

Tabelle 3. Absättigungsversuch ohne Enzymvorbehandlung der Blutspur. Ansatz wie oben.

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	±	(+)	-	-	-	-	3.5
Stoffkontrolle	++	++	+	+	±	-	1.0
Antiserum	++	++	++	++	+	±	

Ansatz 3

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 2 Tage,
2.5 Tropfen Anti-Fy(b)-Serum inkomplett,
1 Tropfen Bromelin,
5%ige Erythrozyten-suspension,

Absättigung: 25 h bei 37°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 4. Absättigungsversuch mit enzymvorbehandeltem Flecken bei 37°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(b)	+++	++	±	+	(±)	0
Stoffkontrolle	+++	++	++	+	(±)	0.5
Antiserum	+++	+++	++	+	(+)	

Ansatz 4

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet, Spurenalter: 13 Tage,
2.5 Tropfen Anti-Fy(b)-Serum inkomplett,
1 Tropfen Bromelin,
5%ige Erythrozyten-Suspension,
Absättigung: 15 h bei 22°C,
Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 5. Absättigungsversuch mit enzymvorbehandeltem Flecken bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(b)	+	±	±	±	(+)	0
Stoffkontrolle	++	++	(+)	±	-	0
Antiserum	+	±	±	±	-	

Ein Parallelversuch ohne Bromelin erbrachte folgendes Ergebnis:

Tabelle 6. Absättigungsversuch ohne enzymvorbehandeltem Flecken. Ansatz wie oben

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(b)	+	+	-	-	-	2.5
Stoffkontrolle	(++)	++	+	±	-	0
Antiserum	+	±	±	±	-	

Wie aus den Tabellen zu ersehen ist, kann man die Fy-Merkmale im Enzymtest nicht nachweisen. Es ergab sich keine deutliche Reduktion in wenigstens 2 Stufen. Die Vergleiche von Fy(a) und Fy(b) mit und ohne Bromelin zeigten einen Unterschied, der aber nicht reproduzierbar war (s. Tab. 2, 3, 5, 6 und Besprechung der Ergebnisse).

Dagegen läßt sich erklären, warum sich die Fy -Merkmale im Enzymtest dem Nachweis entzogen: 1950/51 stellten GUTHBUSH, MOLLISON und PARALL fest, das Duffy-Blutgruppensubstanzen an Protein gebunden sind und durch proteolytische Fermente wie Trypsin, Papain und Bromelin zerstört werden.

2.2.2.2. Albuminversuch

Nunmehr wurden Absättigungsversuche mit Rinderalbumin als Suspensionsmedium zum Nachweis der Fy -Merkmale unternommen. Hierbei wurden in jedes Röhrchen der Verdünnungsreihe 2 Tropfen Rinderalbumin statt $CaCl_2$ -Lösung vorgelegt. Von den einzelnen Serumverdünnungsstufen wurde je 1 Tropfen auf eine Tüpfelplatte gegeben. Zu jedem dieser Tropfen wurde 1 Tropfen 5%ige Erythrozyten-Suspension pipettiert, die mit 20%igem Rinderalbumin ausgesetzt worden war. Serum und Blutzellen wurden gut durchmischt und 1 Stunde bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Die Reaktion wurde dann unter leicht kreisenden Bewegungen abgelesen.

2.2.2.3. Versuche ohne Fermentzusatz

Ansatz 5

Vorlage: 1 cm^2 Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 51 Tage,
 3 Tropfen Anti- $Fy(a)$ -Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 41 h bei $4^{\circ}C$,
 Inkubation: 1 h bei $37^{\circ}C$.

Tabelle 7. Absättigungsversuch bei $4^{\circ}C$

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Titerabfall in Stufen
Spur $Fy(a)$	++	++	+	+	+	(+)	-	1.0
Stoffkontrolle	++	++	++	+	+	(+)	(+)	0
Antiserum	+++	++	+++	+	(+)	(+)	-	

Es wurden nur 2 Absättigungsverfahren bei 4°C gemacht.
wie es sich später herausstellte, ist diese Temperatur
völlig ungeeignet.

Ansatz 6

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 19 Tage,
5 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension,
Absättigung: 18 h bei 22°C,
Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 8. Absättigungsversuch bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	+	+	-	-	-	-	2.5
Stoffkontrolle	+++	+++	++	±	-	-	0.5
Antiserum	+++	+++	++	+	-	-	

Ansatz 7

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 19 Tage,
5 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension,
Absättigung: 12 h bei 37°C,
Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 9. Absättigungsversuch bei 37°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	++	++	+	(+)	±	0
Stoffkontrolle	++	++	±	+	-	0
Antiserum	(+++)	++	±	+	-	

Ansatz c

Vorlage: 1 cm² Leinenstück, durchtränkt mit konzentrierter (mehrfach aufgetropfter) Blutmenge, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1/2 Tag,
 3 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 22 h bei 22°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 10. Absättigungsversuch bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	+	+	±	±	±	±	-	0.5
Stoffkontrolle	++	++	++	(++)	±	(+)	-	1.5
Antiserum	++	++	++	(++)	+	±	(±)	

Tabelle 11. Absättigungsversuch bei 37°C, Ansatz wie oben

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(a)	±	+	±	±	±	±	-	0
Stoffkontrolle	++	++	++	(+)	±	(±)	-	1.0
Antiserum	++	++	++	(++)	+	±	(±)	

Tabelle 15. Absättigungsversuche zum Nachweis von Fy(a) bei 37°C

Spuren- alter (Tage)	Absät- tigungs- zeit (h)	Mit Bromelin	Ohne Bromelin	Luft- getrock- net	Kühl- schrank- getrock- net	NaCl- Titer	Stärke des Titers	Kontroll- Titer	Stärke des Titers	Spur- Titer	Stärke des Titers	Ergebnis
0.5	22	-	X	X	-	1/120	n	1/64	n	1/64	(s)	-
4	12	-	X	X	-	1/8	n	1/8	n	1/32	n	-
5	14	-	X	-	X	1/16	n	1/64	n	1/16	(n)	-
25	12	-	X	X	-	1/64	n	1/32	n	1/32	n	-

In der gleichen Reihenfolge wurden Blutspuren auf $Fy(b)$ -
Merkmale untersucht:

Ansatz 9

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 13 Tage,
3 Tropfen Anti- $Fy(b)$ -Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 15 h bei 4°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 14. Absättigungsversuch bei 4°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur $Fy(b)$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	-	-	2.0
Stoffkontrolle	+	$\pm$	$\pm$	-	-	0
Antiserum	+	+	$\pm$	(+)	($\pm$)	

Ansatz 10

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 15 Tage,
3 Tropfen Anti- $Fy(b)$ -Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 22 h bei 22°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 15. Absättigungsversuch bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur $Fy(b)$	$\pm$	-	-	-	-	1.5
Stoffkontrolle	(++)	+	-	-	-	2.0
Antiserum	+	+	$\pm$	$\pm$	-	

Ansatz 11

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet,
 Spurenalter: 14 Tage,
 3 Tropfen Anti-Fy(b)-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 24 h bei 37⁰C,
 Inkubation: 1 h bei 37⁰C.

Tabelle 16. Absättigungsveruch bei 37⁰C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(b)	++	±	-	-	-	2.0
Stoffkontrolle	+	+	±	-	-	1.0
Antiserum	++	(+)	±	(+)	(±)	

Ansatz 12

Vorlage: 1 cm² Leinenstück, durchtränkt mit 3 Tropfen Blut, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1/2 Tag,
 weiterer Ansatz wie oben,
 Absättigung: 22 h bei 22⁰C,
 Inkubation: 1 h bei 37⁰C.

Tabelle 17. Absättigungsveruch bei 22⁰C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur Fy(b)	±	+	±	±	(±)	(±)	0
Stoffkontrolle	(+)	±	(+)	(+)	(±)	-	0
Antiserum	(++)	+	(+)	±	(±)	-	

Tabelle 18. Absättigungsversuch bei 37⁰C, Ansatz wie oben

Liter	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Literabfall in Stufen
Spur Fy(b)	+	+	<u>±</u>	<u>±</u>	(<u>±</u>)	(<u>±</u>)	0.5
Stoffkontrolle	(+)	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	+	+	0
Antiserum	(++)	+	(+)	<u>±</u>	(<u>±</u>)	-	

Tabelle 19. Absättigungsversuch zum Nachweis von My(b) bei 22°C mit und ohne Bromelin

Spuren- alter (Tage)	Absätti- gungs- zeit (h)	Mit Bromelin	Ohne Bromelin	Luft- trock- net	Kühl- schrank- Getrock- net	1/64	n	1/32	s	1/64	s	Stärke Kontroll- Titer des Titters	Stärke Spur des Titer des Titters	Stärke Ergebnis
0.5	22	-	-	-	-	1/64	n	1/32	s	1/64	s	-	-	-
7	15	A	-	A	-	1/128	st	1/16	st	1/2	(n)	+	+	+
8	15	A	-	A	-	1/32	st	1/32	(n)	1/16	st	+	+	+
10	15	-	-	-	-	1/32	st	1/16	st	1/4	st	+	+	+
12	15	-	-	-	-	1/16	s	1/16	s	1/16	s	-	-	-
12	15	-	-	-	-	1/16	s	1/16	n	1/2	s	-	-	-
12	15	-	-	-	-	1/16	s	1/16	s	1/4	s	+	+	+
15	22	-	-	-	-	1/16	s	1/4	(n)	1/2	(n)	+	+	+
14	17	-	-	-	-	1/32	n	1/16	s	-	s	+	+	+
14	24	-	A	-	-	1/16	n	1/2	n	1/4	(s)	-	-	-
15	2	-	-	-	-	1/16	s	1/32	s	1/2	s	-	-	-

Tabelle 20. Absättelungsversuche zum Nachweis von Thy(s) mit und ohne Bromelin bei 77° C

Spuren- alter (Tage)	Absätt- lungs- zeit (h)	mit Bromelin	Ohne Bromelin	Luft- trock- net	Küli- schränk- verpack- net	Luft- trock- net	Stärke kontroll- litter des Mitters	Stärke des Mitters	Spur- Stärke des Mitters	Stärke des Mitters
0.5	22	-	-	-	-	1/32	1/64	s	1/64	s
1	3.2	-	-	-	-	1/32	1/16	(n)	1/16	n
2	25	-	-	-	-	1/32	1/32	st	1/32	st
3	1.40	-	-	-	-	1/32	1/4	s	1/2	s
6	2	-	-	-	-	1/32	1/16	st	1/16	n
19	20	-	-	-	-	1/32	1/32	(st)	1/16	s
14	24	-	-	-	-	1/32	1/16	s	1/4	n

unspezifische
Absättelung

2.2.3. Besprechung der Ergebnisse

Es hat sich herausgestellt, daß der sonst zuverlässige Absättigungsversuch in der Modifikation des Coombs-Testes zur Untersuchung von Fy -Merkmalen unbrauchbar ist. Es wurden zur $Fy(a)$ -Bestimmung Versuche bei $4^{\circ}C$, $22^{\circ}C$ und $37^{\circ}C$ Absättigungstemperatur gemacht, wobei bei $4^{\circ}C$ und $37^{\circ}C$ keine brauchbaren Ergebnisse erzielt wurden. Bei $22^{\circ}C$ war immerhin eine Reduktion bis zu 2 Stufen, 3mal sogar bis zu 3 Stufen, zu verzeichnen (Tab. 12). Diese Reduktion des Spurentiters gegenüber dem Nulltiter läßt aber keinen eindeutigen Schluss hinsichtlich der Merkmalszugehörigkeit zu, da eine spezifische Titer Senkung mindestens 3 volle Stufen betragen soll.

Dieselben Versuche wurden zur $Fy(b)$ -Bestimmung vorgenommen. Das Anti- $Fy(b)$ -Serum (Diocest) hatte aber einen so schwachen Titer, daß weder bei $4^{\circ}C$, $22^{\circ}C$ noch bei $37^{\circ}C$ deutliche Unterschiede gegenüber dem $NaCl$ - und Stoffkontrolлтiter festgestellt werden konnten.

2.3. Ss-Merkmale

2.3.1. Versuche

2.3.1.1. Präcipitinversuche

Wie schon bei den Fy -Untersuchungen das offene, wurden auch Ss-Spurenstoffe zerlegt und mit Bromelin vorbehandelt. Auch hier stellte sich kein deutlicher Titerunterschied heraus, im Gegenteil, es kam bei der S-Spurenuntersuchung mit Bromelin immer zu unspezifischen Absättigungen in der blutfreien Stoffkontrolle.

Ansatz 13

Vorlage: 1 cm^2 Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 1/2 Tag,
3.5 Tropfen Anti-S-Serum komplot,

1 Tropfen Bromelin,
5 µl Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 17 h bei 4°C,

Inkubation: 1.5 h bei Raumtemperatur.

Tabelle 21. Absättigung mit enzymvorbehandeltem Flecken bei 4°C.

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur SS	+++	++	+	-	-	2.0
Stoffkontrolle	+++	++	++	+	+	0
Antiserum	+++	++	+	±	-	

Zum Vergleich wurde derselbe Ansatz ohne Bromelin hergestellt.

Tabelle 22. Absättigungsversuch ohne enzymvorbehandlung bei 4°C. Ansatz wie oben

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur SS	-	-	-	-	-	4.0
Stoffkontrolle	+++	++	++	(+)	-	0.5
Antiserum	+++	++	+	±	-	

Weiterhin wurden bei 22°C Absättigungstemperatur 3 Bromelinversuche und bei 37°C 4 Bromelinversuche vorgenommen. Bei beiden Temperaturen war kein deutlicher Titerunterschied zu verzeichnen.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen mit enzymvorbehandelten ss-tragenden Fleckensubstanzen. Sie wurden bei 4°C, 22°C und 37°C Absättigungstemperatur untersucht und ergaben bei allen 3 Temperaturen nur unspezifische Absättigungen. Da auch das Merkmal S, ebenso wie die Merkmale R, K und S an Protein gebunden ist, wird es nach Behandlung mit proteolytischen Enzymen wie Bromelin zerstört (z.B. 21, 22, 23, 24, 25).

Ansatz 14

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 7 Tage,
 3.5 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,
 1 Tropfen Bromelin,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 13 h bei 22°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 23. Absättigungsversuch mit enzymvorbehandelten Flecken bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur ss	-	-	-	-	-	0
Stoffkontrolle	-	-	-	-	-	2.0
Antiserum	++	++	(++)	+	(+)	

2.3.1.2. Albuminversuche

Die Untersuchungen auf Sb- und ss-Merkmalen im Albuminverfahren waren ebenso ergebnislos wie die auf ry-Merkmale.

2.3.1.3. Coombs-Test ohne Bromelin und S-Nachweisverfahren

wie schon erwähnt, lassen sich ry- und s-Merkmale mit inkompletten Antiseren nur im Coombs-Test nachweisen, während man S mit kompletten Antiseren im Direktverfahren nachweisen kann:

1. Wie bei den anderen Merkmalsuntersuchungen wurden Ansätze bei 4°C, 22°C und 37°C, jeweils mit Stoffkontrolle, hergestellt.
2. Die Inkubationszeit betrug mit einigen Ausnahmen mindestens 12 Stunden.
3. Herstellung einer 2-5%igen Erythrozyten-Suspension nach 1-3maligem Waschen.
4. In jede Vertiefung einer Tüpfelplatte wurden 2 Tropfen NaCl-Lösung gegeben.

5. Dann wird je eine Verdunnungsreihe vom Antiserum auf dem spuren- und dem Stoffkontrollsubstrat und außerdem eine NaCl-Titerreihe angelegt.

6. Nach Verdunnung gut durchmischen.

7. Dann gibt man in jede Vertiefung 1 Tropfen Erythrozyten-suspension, nochmals mischen.

8. Mindestens 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen lassen.

9. Bei kreisenden Bewegungen ablesen.

Ansatz 15

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,

Spurenalter: 1 Tag,

5 Tropfen Anti-S-Serum komplett,

5%ige Erythrozyten-suspension,

Absättigung: 37 h bei 4°C,

Inkubation: 2 h bei Zimmertemperatur.

Tabelle 24. Absättigungsversuch bei 4°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	Titerabfall in Stufen
Spur Su	-	-	-	-	3.0
Stoffkontrolle	+++	+++	+	-	0
Antiserum	+++	++	+	-	

Ansatz 16

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet,

Spurenalter: 7 Tage,

3 Tropfen Anti-S-Serum komplett,

5%ige Erythrozyten-suspension,

Absättigung: 19 h bei 4°C,

Inkubation: 3 h bei Zimmertemperatur.

Tabelle 25. Absättigungsversuch bei 4°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur SS	++	++	+	-	-	1.5
Stoffkontrolle	+++	++	++	(+)	-	0
Antiserum	+++	++	++	(+)	-	

Ansatz 17

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1/2 Tag,
 3 Tropfen Anti-S-Serum komplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 23 h bei 22°C
 Inkubation: 3.5 h bei Zimmertemperatur.

Tabelle 26. Absättigungsversuch bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur SS	++	++	+	±	-	1.5
Stoffkontrolle	++	++	++	+	(+)	0
Antiserum	++	++	++	+	±	

Ansatz 18

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 6 Tage,
 3 Tropfen Anti-S-Serum komplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 24 h bei 37°C,
 Inkubation: 3 h bei Zimmertemperatur

Tabelle 27. Absättigungsversuch bei 37°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	Titerabfall in Stufen
Spur SS	+++	+++	++	(+)	-	0.5
Storikontrolle	+++	+++	++	+	-	0
Antiserum	+++	+++	++	+	-	

Tabelle 29. Absättigungsversuche zur Gewinnung von 3 bei 110°C ohne und ohne Bromelin

Spuren- alter (rate)	Absätt- zeit (h)	Mit Bromelin	Ohne Bromelin	Luft- getrock- net	Rühl- schrank- getrock- net	absätt- titer titers	Stärke titers	Kontroll- titer	absätt- titer titers	Stärke titers	Stärke titers	Stärke titers
0.5	25	-	-	-	-	1/2	-	1/2	n	1/10	-	-
3	17.5	-	-	-	-	1/2	st	1/16	st	1/32	st	-
4	12	-	-	-	-	1/2	(n)	-	-	-	-	unspezifische Absättigung
5	15	-	-	-	-	1/15	n	1/2	n	-	-	-
6	16.5	-	-	-	-	1/2	st	1/2	n	1/2	st	-

Tabelle 20. Absättigungsversuche zum Nachweis von S bei 27°C mit und ohne Bromelin

Spuren- alter (Tage)	Absät- tigungs- zeit (h)	Mit Bromelin	Ohne Bromelin	Luft- Getrock- net	Kühl- schrank- Getrock- net	LaCl- Miter Titers	Stärke Kontroll- Miter Titers	Stärke Spur- des Miter des Titers	Stärke Ergebnis des Titers
5	16	+	-	-	+	1/16	st	1/16	st
5	16	-	+	-	+	1/32	n	1/16	n
6	24	+	-	+	-	1/16	st	1/4	(n)
6	16.5	+	-	+	+	1/16	st	-	-
6	24	-	+	+	-	1/16	st	1/16	st
7	12	-	+	+	-	1/16	st	1/32	st
9	15.5	-	+	-	+	1/32	st	1/16	st
11	20	+	-	+	-	1/16	n	1/16	n

- (+) +
unspezifische
Absättigung

+

ss-Merkmale wurden im Coombs-Test mit inkompletten Antiseren bei 4°C, 22°C und 37°C untersucht:

Ansatz 19

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet,
 Spurenalter: 1 1/2 Tage,
 3 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 24 h bei 4°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 31. Absättigungsversuch bei 4°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur ss	+++	++	++	±	(+)	-	0
Stoffkontrolle	+++	+++	++	+	(+)	-	1,0
Antiserum	+++	+++	++	+	(+)	(+)	

Ansatz 20

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1/2 Tag,
 3 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 22 h bei 22°C
 Inkubation: 1 h bei 37°C

Tabelle 32. Absättigungsversuch bei 22°C

Titer	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Titerabfall in Stufen
Spur ss	++	++	±	(+)	(+)	(+)	0
Stoffkontrolle	+++	+++	++	++	±	(+)	0
Antiserum	+++	+++	+++	++	++	(+)	

Ansatz 21

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1/2 Tag,
 3 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 22 h bei 37°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C

Tabelle 33. Absättigungsversuch bei 37°C

Titel	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	Witersabrall in Stufen
Spur ss	++	(++)	+	±	±	(±)	0,5
Stoffkontrolle	+++	+++	++	++	±	(+)	0
Antiserum	+++	+++	+++	++	++	(±)	

Tabelle 25. Absättigungsversuche zum Nachweis von s bei 37°C mit und ohne Bromelin

Spuren- alter (Tage)	Absät- tigungs- zeit (h)	Mit Bromelin	Ohne Bromelin	Leck- gefäß- net	Kühl- schrank- getrock- net	1/54	st	1/64	st	1/32	st	Spur- Riter des Meters	Stärke Riter des Meters	
0.5	22	-	-	-	-	1/54	st	1/64	st	1/32	st	-	-	unspezifische Absättigung
1	5.5	-	-	-	-	1/15	st	1/10	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
2	25	-	-	-	-	1/32	st	1/15	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
2	1.4	-	-	-	-	1/32	st	1/10	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
6	2	-	-	-	-	1/54	st	1/10	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
11	17	-	-	-	-	1/54	st	-	-	-	-	-	-	unspezifische Absättigung
14	10	-	-	-	-	1/32	st	1/12	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
15	3	-	-	-	-	1/34	st	1/11	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
15	22	-	-	-	-	1/54	st	1/11	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung
20	12	-	-	-	-	1/54	st	1/12	st	1/12	st	-	-	unspezifische Absättigung

2.3.2. Besprechung der Ergebnisse

Auch bei den Untersuchungen von b- und s-Merkmalen in Blutspuren mit Hilfe des Absättigungsversuches waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Bei der S-Untersuchung bei 4°C Absättigungstemperatur zeigte sich zwar der Spurentiter gegenüber dem Aktiv- und Kontrolltiter etwas schwächer; aber auch hier war eine Reduktion um 3 Stufen nicht zu verzeichnen. Die Ergebnisse bei 22°C und 37°C zeigten noch nicht einmal diesen kleinen Titerunterschied.

Ebenso wie bei den Ty-Merkmalen war bei der s-Untersuchung bei 4°C kein brauchbares Ergebnis zu erhalten. Wie bei Ty(a) zeigte sich bei 22°C Absättigungstemperatur eine deutliche Abschwächung des Spurentiters gegenüber dem Aktiv- und Kontrolltiter. Auch hier trat aber keine Reduktion um mehr als 2 Stufen ein. Die Untersuchungen bei 37°C verliefen ebenfalls ergebnislos.

Aus diesen Ergebnissen ist zu ersenen, daß Ty- und S-Merkmale im Absättigungsverfahren nur sehr schwer nachweisbar sind, jedenfalls nicht mit den hier beschriebenen Methoden.

Auf die möglichen Fehlerquellen, die beim Absättigungsversuch (und ebenso beim Absorptions-Blutionsversuch, s. später) auftreten können, wurde geachtet: z.B. können falsch positive Resultate durch verunreinigte Glaswaren (Röhrchen) oder schweissdurchtrankte Textilläppchen entstehen. Fehler durch Verunreinigungen (Fett, Schmutz) in den Ansätzen (CUTLERIDGE) oder durch Verunreinigungen der Substrate mit Bakterien (COOMBS) werden für möglich gehalten. Es ist aber so gut wie sicher, daß eine kräftige, unspezifische Agglutininbindung durch saubere Textilien selten auftritt. Schwache Eigenabsorptionen mögen hin und wieder einmal vorkommen, sind aber nicht so stark, daß sie zu Fehlbestimmungen Anlaß geben können. Obwohl bei den vorliegenden Untersuchungen Baumwollstoff verwendet wurde, der im allgemeinen die Blutgruppenbestimmung nicht stört, kann eine schwache Eigenabsorption des Gewebes vorkommen,

da Titerensenkungen der blutfreien Stoffkontrolle gegenüber dem Aktivtiter des Antiserums nur durch Eigenabsorption erklärt werden können.

In gealtertem Blut besetzt bei der Bestimmung des Faktors s eine gewisse Fehlerquote, die ist bei s und $Fy(a)$ am höchsten (0,11%), über $Fy(b)$ liegen noch keine Erfahrungen an Blut in vitro vor.

Da nicht jeden Tag Frischblut als Testzellen zur Verfügung stand, wurden Aufschwemmungen von einwöchigen Leuten bis zu 1.5 Wochen alten Blut, das im Kühlschrank lagerte, hergestellt. Die Aufschwemmungen selbst waren jedoch immer frisch. Die Erythrozyten-Suspension war nicht zu gering konzentriert, so daß es zu keinem Mischverhältnis zwischen Antigenen und Antikörpern kommen konnte. Ein zu starkes Zentrifugieren wurde vermieden.

2.4. Absorptions-Elutionsversuch

2.4.1. Technik

Prinzip:

In der Absorption werden die zu untersuchenden Antigene mit ihren homologen Antikörpern zusammengebracht. Nichtgebundene Antikörper werden danach ausgewaschen. Durch Erhöhung der Temperatur lösen sich die gebundenen Antikörper wieder (Elution). Diese können dann durch Agglutination von Testerythrozyten nachgewiesen werden.

Ausführung:

1. Ein etwa 1 cm^2 großes Stück des zu untersuchenden Blutfleckens wurde ausgeschnitten und in feine Fasern zerlegt.
2. Die Fasern wurden in ein beschriftetes Röhrchen gegeben und mit 2 Tropfen Antiserum durchtränkt.
3. Abgesättigt wurde bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen.
4. 6maliges Waschen mit eiskalter 0.9%iger NaCl-Lösung zur Entfernung nichtgebundener Antikörper. Letzte Waschlösung auf freie Antikörper kontrollieren.

5. Elution: Je nach Methode wurde zugegeben nach der letzten waschung

- a) 1-2 Tropfen Rinderalbumin als Supplement
- b) 1-2 Tropfen 0.9%ige NaCl-Lösung für den Fall, daß mit dem Enzym- oder Antihumanglobulin-Test gearbeitet wurde.

Absprengung (Elution) der ~~nicht~~ gebundenen Antikörper für 30 Minuten bei $56^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$.

Unspezifische Agglutinationen beim Absorptions-Elutionsversuch können durch unzureichendes Auswaschen der Antikörper entstehen. Daher werden die Ansätze 6mal mit eiskalter NaCl-Lösung gewaschen und die letzte Waschflüssigkeit auf Agglutination geprüft. Sie fiel immer negativ aus. Dies ging über die von NICHOLLS und PEREIRA geforderte Bedingungen, bei Leinensubstraten 3mal zu waschen, hinaus.

2.4.1.1. Technik mit Rinderalbumin

Für die Technik in Rinderalbumin empfiehlt MARZIANO, eine 10%ige Erythrozyten-Suspension in Rinderalbumin herzustellen und diese in einem zweiten Röhrchen mit dem Eluat zur Reaktion zu bringen. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei 37°C . Dann wird eine Minute bei 1000 U/min. zentrifugiert und makroskopisch abgelesen.

2.4.1.2. Technik mit kompletten Antiseren

Verwendet man komplette Antiseren, so werden die abgesprengten Antikörper in einem zweiten Röhrchen oder auf einer Trüpfelplatte mit einem Tropfen 5%iger Erythrozyten-Suspension zusammengebracht, 1 Stunde bei 37°C inkubiert; dann wird abgelesen.

2.4.1.3. Antihumanglobulin-Verfahren

Im Antihumanglobulin-Verfahren gibt es 2 Techniken, die ausgeführt wurden:

1. man gibt 2-4 Tropfen einer 2-5%igen Erythrozyten-Suspension zum Eluat. Inkubation: 1 Stunde bei 37°C . Der Überstand wird abgesaugt, anschließend werden die Zellen in NaCl-Lösung resuspendiert. Der Stoff wird verworfen. Nach 3maligem Waschen wird 1 Tropfen der Zellsuspension mit 1 Tropfen Antihumanglobulin-Serum in einem anderen Röhrchen zur Reaktion gebracht. bei 500 - 1000 U/min. zentrifugieren und makroskopisch ablesen.

Da bei dieser Methode die Suspension, die sich aus einem Tropfen Eluat und einem Tropfen Erythrozyten-Suspension zusammensetzte, so dünn war, daß man kaum ein sicheres Ergebnis ablesen konnte, wurde sie modifiziert. Nach der waschung wurde in jedes Röhrchen 1-2 Tropfen 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben. Danach wurde es mit 1-2 Tropfen Antihumanglobulin-Serum beschickt, bei 1000 U/min. zentrifugiert, und die Reaktion abgelesen.

2. Das Eluat wurde mit einer feinen Pipette abgesaugt und in ein zweites, schon mit einem Tropfen einer 5%igen Erythrozyten-Suspension versehenes Röhrchen gegeben. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach 3maligem Waschen wurde ein Tropfen Antihumanglobulin-Serum hinzugegeben, eine Minute bei 1000 U/min. zentrifugiert und die Reaktion makroskopisch abgelesen.

Bei dieser Technik wurde neben der Spuren- und Stoffkontrolle noch eine negative Spurenkontrolle mit erwartet, die eine Blutprobe ohne den Faktor enthält, der nachgewiesen werden sollte.

2.4.2. Versuche

Zur Untersuchung der Ry- und Ss-Merkmale im Absorptions-Elutionsverfahren wurden alle 2 auf dieser Seite aufgeführten Methoden angewendet, teils im sogenannten Röhrentest, teils auf einer Kupfelflatte. Der Ansatz für den Absättigungsversuch (Stoßsubstrat) konnte für den Absorptions-Elutionsversuch weiter verwendet werden. Dabei treten die gleichen Absorptions- oder Absättigungszeiten und auch die gleichen Temperaturen auf. Fast in allen Fällen folgte der Absorptions-Elutionsversuch dem Absättigungsversuch, auch mit den enzymvorbehandelten Spuren.

Blutlecken, die mit Enzym vorbehandelt waren, zeigten im Absorptions-Elutionsversuch keine brauchbaren Ergebnisse. Ebenso ohne positive Reaktionen verliefen die 3 Untersuchungen mit der Rinderalbumintechnik und die 4 Versuche der Technik mit kompletten Anvisieren. In sehr vielen Fällen wurde die Erythrozyten-Suspension in Rinderalbumin angesetzt, was ebenfalls zu negativen Ergebnissen führte.

Ansatz 22

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank getrocknet,
 Spurenalter: 12 Tage,
 2 Tropfen Anti-S-Serum komplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 15 h bei 22°C,
 Elution: 0.5 h bei 56°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C

Tabelle 30. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von S

Spur Ss		-
Stoffkontrolle		-

Nach der unter 2.4.1.3. beschriebenen Technik wurden für den Ss- und Ry-Nachweis im Absorptions-Elutionstest folgende Ergebnisse erzielt:

Ansatz 23

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz,
2 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension.

Tabelle 37

Spurenalter: 14 Tage, Ab-
sättigungszeit: 18 h bei
37°C, luftgetrocknet

Spurenalter: 15 Tage, Absätti-
gungszeit: 22 h bei 37°C, im
Kühlschrank getrocknet

Spur ss	++
Stoffkontrolle	-

Spur ss	+
Stoffkontrolle	-

Ansatz 24

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz,
2 Tropfen Anti-Fy(b)-Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension.

Tabelle 38

Spurenalter: 5 Tage, Ab-
sättigungszeit: 24.5 h
bei 37°C, luftgetrocknet

Spurenalter: 14 Tage, Absätti-
gungszeit: 24 h bei 22°C, im
Kühlschrank getrocknet

Spur Fy(b)	-
Stoffkontrolle	-

Spur Fy(b)	-
Stoffkontrolle	-

Ansatz 25

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
Spurenalter: 19 Tage,
2 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
5%ige Erythrozyten-Suspension,
Absättigung: 18 h bei 22°C,
Elution: 0.5 h bei 56°C,
Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 39. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von Fy(a)

Spur Fy(a)	+++
Stoffkontrolle	(+)

Die folgenden Ansätze wurden nach der Methode 2.4.1.3-2. untersucht; außerdem wurden ganz frische Blutflecken angelegt.

Ansatz 29

Vorläufe: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,
 Spurenalter: 1 Tag,
 2 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,
 5%ige Erythrozyten-Suspension,
 Absättigung: 22, 24 und 36 Stunden bei 37°C,
 Elution: 1/2 h bei 56°C,
 Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 40. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von Fy(a)

Spur Fy(a)	+	+	+
Spur Fy(b)	(+)	(+)	(+)
Stoffkontrolle	-	-	-
Absättigungszeiten	22 h	24 h	36 h

Tabelle 41. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von ss bei 22, 24 und 36 Stunden Absättigungszeit. Ansatz wie oben, nur mit dem Unterschied: 2 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett

Spur ss	++	++	+++
Spur Ss	(+)	(+)	(+)
Stoffkontrolle	-	-	-
Absättigungszeiten	22 h	24 h	36 h

Ansatz 27

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, im Kühlschrank ge-
trocknet,

Spurenalter: 6 Tage,

2 Tropfen Anti-ry(b)-Serum inkomplett,

5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 24 h bei 37⁰⁰,

Elution: 1/2 h bei 56⁰⁰,

Inkubation: 1 h bei 37⁰⁰.

Tabelle 42. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von ry(b)

Spur ry(b)	+
Spur ry(a)	-
Stoffkontrolle	<u>±</u>

Ansatz 28

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,

Spurenalter: 94 Tage oder 3 Monate,

2 Tropfen Anti-s-Serum inkomplett,

5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 24 h bei 37⁰⁰,

Elution: 1/2 h bei 56⁰⁰,

Inkubation: 1 h bei 37⁰⁰.

Tabelle 43. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von s

Spur ss	+
Spur SS	(<u>±</u>)
Stoffkontrolle	(<u>±</u>)

Ansatz 29

Vorlage: 1 cm² Fleckensubstanz, luftgetrocknet,

Spurensuche: 50 µl e,

2 Tropfen Anti-Fy(a)-Serum inkomplett,

5%ige Erythrozyten-Suspension,

Absättigung: 26 h bei 37°C,

Elution: 1/2 h bei 56°C,

Inkubation: 1 h bei 37°C.

Tabelle 44. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von Fy(a)

Spur Fy(a)		±
Spur Fy(b)		-
Stoffkontrolle		-

Tabelle 45. Absorptions-Elutionsversuch zum Nachweis von Fy(b), Ansatz wie oben, nur mit dem Unterschied: 2 Tropfen Anti-Fy(b)-Serum inkomplett

Spur Fy(b)		(+)
Spur Fy(a)		(±)
Stoffkontrolle		(±)

2.4.2. Besprechung der Ergebnisse

Im Fy-System wurden mit Hilfe des Absorptions-Elutionsverfahrens im Gegensatz zum Absättigungsversuch positive, wenn auch hier leider nicht eindeutige Ergebnisse erzielt. Die Fy-Merkmale ließen sich sogar an 3 Monate alten Spuren nachweisen, aber die Agglutination ist für die Auswertung zu gering. Denn auch die Stoffkontrolle und die negative Kontrolle zeigten eine mehr oder minder deutliche Agglutination, obwohl immer die letzte Waschflüssigkeit nach 5maliger Waschung mit eiskalter NaCl-Lösung kontrolliert wurde und zu einem negativen Ergebnis führte.

Der S-Nachweis ließ sich im Absorptions-Elutionsverfahren weder an alten, noch an den frisch angelegten Blutspuren führen. Der s-Nachweis ergab an frischen und 3 Monate alten Blutspuren aber positive Ergebnisse (Tab. 41, 43). Hier war die Differenz gegenüber der blutfreien Kontrolle und der negativen Spurenkontrolle etwas größer als bei den Fy-Untersuchungen, so daß dieses Ergebnis verwertbar erscheint. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von LINCOLN und DODD.

3. Zusammenfassung

Zu prüfen waren Nachweismöglichkeit und -dauer der Blutmerkmale Fy und Ss in Trockenblutspuren. Diese Fragestellung wurde im Absättigungs- und im Absorptions-Elutionsversuch untersucht und zwar mit kompletten und inkompletten Antiseren, außerdem mit und ohne vorherige Behandlung der Blutflecken in Textilien mit Bromelin. Es zeigte sich, wie zu erwarten, eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Titerhöhe der zur Verfügung stehenden Antiseren. Im ganzen gelang schließlich der Nachweis der Eigenschaften Fy und s im Absorptions-Elutionsversuch (obwohl relativ schwach), und zwar bis zu 3 Monaten Spurenalter. Die optimalen Methoden wurden festgelegt. Die Absättigungsversuche haben enttäuscht.

4. Literatur

BORNSCHEUER, V.: Untersuchungen über die optimalen Verfahren von Rh-Faktoren in Blutspuren. Diss. Marburg 1972

DODD, B. and P. LINCOLN: The Detection of the Rh-Antigen S of the MNSS-System in bloodstains. *medicine, Science and the Law*, 291, 1968, Bd.8

DUNSFORD, I. and C. BOWLEY: *Techniques in Blood Grouping*, Edinburgh (Oliver and Boyd) 1955

DUNSFORD, I. and J. GRANT: *The Antiglobulin (Coombs) Test in Laboratory Practice*, Edinburgh (Oliver and Boyd) 1959

GALLASCH, E.: Antikörperteste unter Verwendung von Enzymen. *Ärztl. Lab.* 19, 300, 1971

MAYER, H.: Der Einfluß des Spurenträgers auf die Agglutininbindungsreaktion. Gruppensereologische Untersuchungen am menschlichen Schweiß. Diss. Würzburg 1969

MÜNSCHER, Fr.: Blindversuche zur ABO-, MN-, Hp- und Gm-Bestimmung an Blutflecken. Diss. Marburg 1967

OEPEN, I.: Fehlbestimmung der Faktoren MNSS, Fy(a) sowie der Rhesusfaktor CcDEe an gealterten Blutproben. *Z. gerichtl. Med.* 66, 130, 1969

PROKOP, O. und G. UHLENBRUCK: *Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen*, Leipzig (Thieme) 1966

RUFFIÉ, J. et J. DUCOS: Absorption des anticorps anti-Fy^a par le sang desseché. *C. r. Soc. Biol.* 151, 393, 1957

SCHLEYER, F.: *Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung*, Lübeck (Schmidt-Römhild) 1966

Herrn Prof. Dr. F. Schleyer danke ich
für die Überlassung des Themas und für seine
Beratung bei den Versuchen und der Abfassung
des Textes. Frau Dr. I. Oepen bin ich für ihre
Hilfe ebenfalls dankbar.

Lebenslauf

Am 10. Juli 1944 wurde ich in Cottbus als Tochter des Zahnarztes Dr. Alfons Thielemann und seiner Ehefrau Elfriede, geborene von Germeten, geboren. 1945 siedelten meine Eltern nach Volkmarsen um. Dort besuchte ich die Volksschule von 1951 bis 1955. Im Anschluß daran ging ich an die Marienschule in Warburg/Westf., ein neusprachliches Gymnasium, später von 1959 bis 1961 besuchte ich dann das Realgymnasium in Wolfhagen. Ich verließ die Schule und ging zur Handelsschule Nies in Kassel. Dann machte ich bis 1966 eine Ausbildung als zahnärztliche Helferin durch. Bereits während dieser Ausbildung begann ich mit dem Besuch des Abendgymnasiums für Berufstätige in Kassel. 1967 bestand ich die Reifeprüfung und begann zum Wintersemester mein Zahnmedizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg. Hier legte ich 1968 das Vorphysikum, 1970 das Physikum ab und bestand am 17. 10. 1972 die zahnärztliche Staatsprüfung.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg
die Herren Professoren und Dozenten:

Engelhardt, Haan, Hennis, Hering, Meuser, Janke,
Korb, Pantke, Petri, Pfütz, Rieken, Rohen, Rosemann,
Salfeld, Schiff, Seidel, Schmidt, Schnell.

